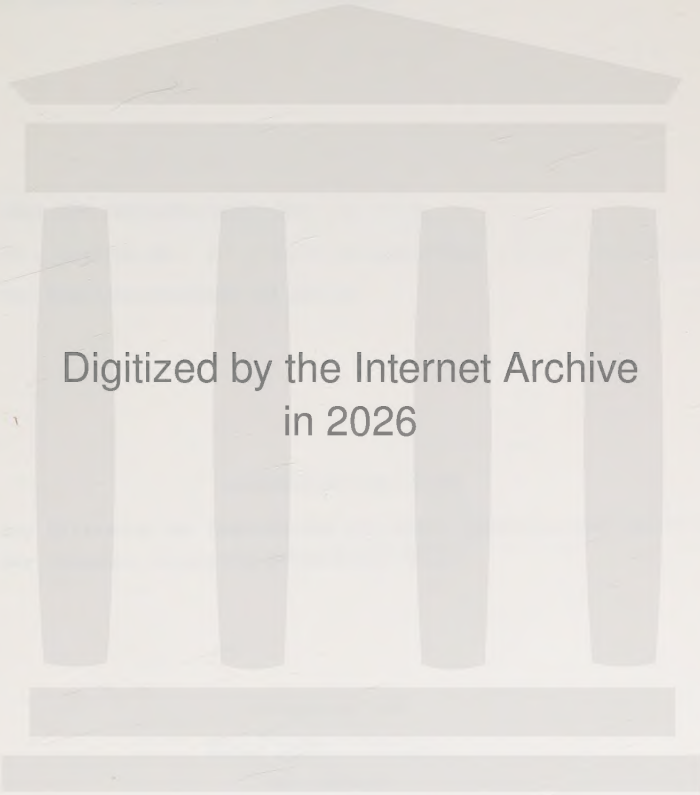


ÜBER DIE VERWENDBARKEIT VON SITS
(4-Acetoamido-4'-Isothiocyanostilben-2,2' Disulfonsäure)
ZUR MEMBRANMARKIERUNG AM HERZEN

KLAUS MARTIN THEISEN

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554426_0015

Aus dem Pharmakologischen Institut der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. Kuschinsky

ÜBER DIE VERWENDBARKEIT VON S I T S

(4 - Acetoamido - 4' - Isothiocyanostilben - 2, 2' Disulfonsäure)

ZUR MEMBRANMARKIERUNG AM HERZEN

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

KLAUS MARTIN THEISEN

aus Koblenz

Mainz 1972

Dekan: Professor Dr. K.H. Bäßler
Referent: Professor Dr. W. Klaus
Koreferent: Professor Dr. G. Kuschinsky

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Januar 1973

Gesamtherstellung:



DITTERS BÜRODIENST

6501 HEIDESHEIM/RHEIN · AM KAPELLECHEN 1
TELEFON 0 61 32 / 57 11



MEINEN ELTERN GEWIDMET

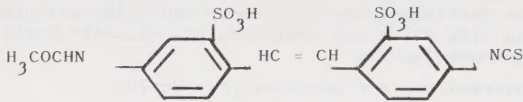
INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG
2. METHODEN UND MATERIAL
 - 2.1 Photometrische und fluorimetrische Messungen
 - 2.2 Volumenkonstante Perfusion von Meerschweinchenherzen zur Bestimmung von Invasions- und Eliminationskurven von SITS sowie zur Gewinnung von mit SITS markiertem Herzmuskelgewebe
 - 2.3 Aufarbeitung der perfundierten Herzen
 - 2.4 Histologische Untersuchungen
 - 2.4.1 Herz
 - 2.4.2 Leber
 - 2.5 Statistische Auswertung
 - 2.6 Material
3. ERGEBNISSE
 - 3.1 Ausarbeitung einer Methode zur Messung von SITS im Herzmuskelhomogenat
 - 3.1.1 Absorptionsspektren von SITS in Tris-HCL-Puffer mit und ohne Albuminzusatz
 - 3.1.2 Absorptionsspektren des Herzmuskelhomogenats in seiner Veränderung durch Zugabe von SITS
 - 3.2 Perfusion von Meerschweinchenherzen mit SITS-Tyrode-Tris-Lösung
 - 3.2.1 Beeinflussung der Kontraktionsamplitude
 - 3.2.2 Invasions- und Eliminationskurven
 - 3.2.3 Bestimmung des SITS-Gehaltes der mit SITS-Tyrode-Lösung perfundierten Herzen
 - 3.3 Fluoreszenzmessungen
 - 3.3.1 Excitations- und Emissionsspektren von SITS
 - 3.3.2 Histologische Untersuchungen
 - 3.3.2.1 Herz
 - 3.3.2.2 Leber
4. DISKUSSION
5. ZUSAMMENFASSUNG
6. LITERATURVERZEICHNIS
7. LEBENSLAUF

1. EINLEITUNG

In neuerer Zeit zeigen sich verschiedene Bestrebungen, Zellmembranen gezielt zu markieren, um ihren Anteil am Gewebe entweder direkt mikroskopisch oder nach Homogenisierung und Fraktionierung quantitativ bestimmen zu können.

Zu diesem Zwecke synthetisierte MADDY⁵ (1964) den Fluoreszenzfarbstoff SITS (4- Acetoamido - 4' - Isothiocyanostilbene - 2, 2' - Disulfonic Acid)



mit folgenden wesentlichen Merkmalen zur Markierung der äußeren Zellmembran:

- 1.1 Der Farbstoff sollte die Barriere der Zellmembran zwischen Extrazellulärraum und Intrazellulärraum nicht durchdringen. (Verwirklicht durch hydrophile Sulfonsäuregruppen, die die Passage durch die Lipoidmembran der Zellwand verhindern)
- 1.2 Der Stoff sollte mit der Membran unter physiologischen Bedingungen (Temperatur, pH und osmotischer Druck) reagieren, ohne die Zelle zu zerstören (Isothiocyanat-Gruppe).
- 1.3 Der Stoff sollte in kleinsten Mengen mit einfachen Untersuchungen (Mikroskop, Photometrie) gut erkennbar und auch quantitativ messbar sein (Fluoreszierendes Stilbengerüst).

MADDY⁵ konnte mit seinen Untersuchungen an Erythrocyten zeigen, daß SITS selektiv die Membranen anfärbt. In diesem Zusammenhang vermutete er, daß dieser Stoff sich auch mit anderen Säugetierzellmembranen verbindet, ohne in die Zelle einzudringen und mit anderen Strukturen zu reagieren.

MARINETTI und GRAY⁶ (1967) bestätigten diese Vorstellung mit ihren Versuchen an isolierten Leberzellen und an intakten Lebern, die mit SITS-Lösungen perfundiert wurden. Sie kamen zur Auffassung, daß SITS spezifisch in der (mittels Differenzialzentrifugation gewonnenen) Membranfraktion gespeichert wird.

Die SITS-Bestimmung wurde in diesen Versuchen halbquantitativ mit Fluoreszenzmessungen durchgeführt.

Im Rahmen von Untersuchungen der quantitativen Analyse der subzellulären Verteilung von Enzymen (spez. ATPasen) ergab sich die Fragestellung, ob SITS auch am Herzmuskel selektiv Membranen zu markieren vermag und ob diese nach Aufarbeitung des Herzens in subzelluläre Fraktionen durch ihren SITS-Gehalt genau lokalisiert und quantitativ erfaßt werden können. Hierzu wurden mit Hilfe der Doppelwellenlängenspektrophotometrie Untersuchungen über das Verhalten von SITS unter verschiedenen Lösungsbedingungen (Milieufaktoren) und über das Bindungsvermögen von SITS im volumenkonstant perfundierten Meerschweinchenherzen durchgeführt. Direkte Hinweise über die subzelluläre Lokalisation von SITS wurden an histologischen Schnitten fluoreszenzmikroskopisch gewonnen.

2. METHODEN UND MATERIAL

2.1 Photometrische und fluorimetrische Messungen

Differenzspektren von SITS in 0,2 M Tris-Lösung ($\text{pH} = 7,4$) gegen Vergleichs-Tris-Lösung sowie von SITS in 0,5 %igem Herzmuskelhomogenat gegen Tris-Lösung wurden mit einem Doppelwellenlängenphotospektrometer (AMINCO-CHANCE) in der Split-Beam-Methode nach Abgleich der Basislinie registriert. Die Messung von SITS im Homogenat erfolgte mittels der DUAL WAVE LENGTH Methode, die auch in diesen trüben Proben eine ausreichende Absorptionsmessung im Bereich von 250 - 400 nm erlaubt.

Die Fluoreszenzspektren von SITS wurden mit einem Spektrofluorometer-Zeiss (ZFM 4 C) bei verschiedenen Excitationswellenlängen in 0,2 M Tris-Lösung sowie in 2 M KOH-Lösungen registriert.

2.2 Volumenkonstante Perfusion von Meerschweinchenherzen zur Bestimmung der Invasions- und Eliminationskurven von SITS sowie zur Gewinnung von SITS-markiertem Herzmuskelgewebe

Für die Versuche wurden 280 - 340 g schwere Meerschweinchen beiderlei Geschlechts verwandt. Nach Tötung durch Genickschlag erfolgte schnelle Excision des Herzens und dessen Präparation in carbogendurchperlter Tyrode-Tris-Lösung (s.U.). In die Aorta wurde eine Metallkanüle eingebunden, über die eine volumenkonstante Perfusion des Coronargefäßsystems mittels einer Schlauchpumpe erfolgte (Durchfluß ca. 10 ml/Min, Perfusionsdruck: 40 - 60 mm Hg).

Die mechanischen Aktivitäten des Herzens wurden mit Hilfe eines Ballonkatheters im linken Ventrikel über einen Statham-Druckwandler auf einem Direktschreiber (Helco-Scriptor) aufgezeichnet. Bei jedem Versuch wurden die Ausschläge mittels eines Quecksilber-Manometers eingeeicht.

Die Perfusion wurde mit einer Tyrode-Tris-Lösung folgender Zusammensetzung vorgenommen:

NaCl 149 mM	KCl 5,4 mM
CaCl ₂ 0,9 mM	NaH ₂ PO ₄ 0,42 mM
MgCl ₂ 1,05 mM	NaHCO ₃ 11,9 mM
1 g Glucose/l	Tris 0,2 mM
pH nach Begasung mit Carbogen: 7,25	

Die Herzen wurden supramaximal mit 180 Reizen/Min. (4 msec. Dauer, 60 - 80 V) gereizt, wobei die Aortenkanüle und der Ballonkatheter als Reizelektroden dienten.

Nach einer Vorlaufperiode von 30 - 40 Min. Dauer mit der Kontrolllösung wurde das Herz für 20 Min. mit einer 100 µM SITS-haltigen Tyrode-Tris-Lösung perfundiert und anschließend für 15 Min. mit Tyrode-Tris-Lösung ausgewaschen.

Zur Aufstellung der Invasions- und Eliminationskurven wurde das Perfusat in halbminütigen Abständen mittels eines Gilson-Fraktionensammlers aufgefangen.

Da die 100 μ M SITS-Lösung in den einzelnen Versuchen verschiedene Extinktionen (bei der Meßwellenlänge 334 nm) erbrachte, wurde die jeweils ermittelte Extinktion der SITS-Tyrode-Lösung als 100 Prozent gesetzt. Dieser Wert stellte sich im Perfusat regelmäßig in der 7. Minute ein.

Zur Prüfung einer möglichen inotropen Wirkung von SITS wurde die Kontraktionsamplitude im Zeitraum 5 Minuten vor Beginn der Perfusion mit SITS als 100 angesetzt und die anschließend erzielte Kontraktionsamplitude als prozentuale Änderung angegeben.

2.3 Aufarbeitung der perfundierten Herzen

Die Herzen wurden nach Ende des Auswaschens sofort von der Perfusionsapparatur abgenommen und weiterverarbeitet.

Die Vorhöfe und das bindegewebige Herzskelet wurden verworfen, die Ventrikel in drei Teile (rechte und linke Außenwand sowie Septum) zerschnitten und nach Abtupfen mit saugfähigem Papier zwischen Filterpapier unter standardisierten Bedingungen für zwei Minuten abgepreßt.

Diese drei Stücke wurden dann in einem Mikrofleischwolf (Braun, Melsungen) zerkleinert. Anschließend wurde das Gewicht des so erhaltenen Gewebestreifens ermittelt und dann mit einer 0,2 M Tris-HCl-Lösung (pH 7,4) ein 5 %iges (G/G) Homogenat hergestellt. Eine weitere Zerkleinerung wurde dann im automatischen Zellhomogenisator (Fa. Colora) innerhalb von 6 - 7 Minuten vorgenommen.

2.4 Histologischen Untersuchungen *

2.4.1 Herz

Die zu histologischen Untersuchungen verwandten Herzen wurden an einer Langendorffapparatur mit einem konstanten Druck von 60 cm H₂O perfundiert.

Nach Äquilibration mit Kontroll-Tyrode-Lösung wurden für 15 - 60 Min. die Präparate mit SITS-Tyrode-Lösung verschiedener SITS-Konzentrationen (20 - 100 μ M) perfundiert und anschließend mit Kontroll-Tyrode-Lösung 15 Min. zur Entfernung des nicht gebundenen SITS ausgewaschen. Die Präparate wurden in 35 %iger Formalinlösung (pH 7,4) während 24 Stunden fixiert. Danach wurden mit einem Gefrierschnittmikrotom 15 - 20 μ dicke Schnitte hergestellt und auf Objektträger in Glycerin eingedeckt. Diese ungefärbten Schnitte wurden zu fluoreszenz- und polarisationsoptischen Untersuchungen verwandt. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden mittels Wasserstoffdampf- und Geradsichtmonochromator von Leitz bei Verwendung eines Excitationsfilters von 370 nm sowie eines Okularsperrfilters UVA K 470 durchgeführt. Im Strahlengang befand sich ein Wärmeschutzfilter (BG 38). Zusätzlich wurden mittels Mikrospectralspektroskopes (Leitz) die Maxima der emittierten Spektren zur Identifizierung der fluoreszierenden Substanz festgestellt.

Die Farbaufnahmen wurden mit einem Kodachrome-II A-Film (DIN 17) angefertigt.

* Für die Beratung und Hilfe bei der Durchführung dieser Untersuchungen möchte ich Herrn Professor Dr. Ehrenbrand vom Institut für Anatomie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, vielmals danken.

2.4.2 Leber

Vergleichende Messungen an der perfundierten Rattenleber wurden in Analogie zu den Untersuchungen von MARINETTI und GRAY⁶ (1967) unternommen.

Ratten von 250 g wurden mit 1,5 ml einer 20 %igen Urethan-Lösung (Gewicht/Volumen) narkotisiert und anschließend die Leber von der Pfortader aus in situ perfundiert, wobei der Ductus Choledochus und die Vena cava superior drainiert waren (Tris-Tyrode-Lösung wie bei der Herzperfusion, Perfusionsdruck: 60 cm H₂O).

Nach Äquilibration mit Carbogen-durchperlter Tyrode-Lösung wurde das Präparat während 30 Minuten mit SITS-Tyrode-Lösung perfundiert und anschließend für 15 Minuten mit normaler Tyrode-Lösung ausgewaschen. Die histologische Aufarbeitung erfolgte in gleicher Weise wie beim Herzen.

2.5 Statistische Auswertung *

Zur statistischen Auswertung wurden Regressionsgeraden bestimmt, die Mittelwerte ($\bar{x}$) und die Schätzung der Standardabweichung der Mittelwerte ($S_{\bar{x}}$) nach der Methode von LORD ⁶ (1947) errechnet, sowie T-Teste nach der Student-Verteilung ermittelt.

2.6 Material

SITS wurde von der Firma Roth, Karlsruhe, bezogen.

* Die Beratung für die statistische Auswertung der Versuche erfolgte dankenswerterweise durch Herrn Professor Dr. Horbach vom Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

3. ERGEBNISSE

3.1 Ausarbeitung einer Methode zur Messung von SITS im Herzmuskelhomogenat

3.1.1 Absorptionsspektrum von SITS in Tris-HCl-Puffer mit und ohne Albuminzusatz

Bei Aufzeichnung der Absorptionsspektren von SITS in 0,2 M Tris-HCl-Lösung (pH 7,4) findet sich ein Absorptionsmaximum bei 315 - 320 nm. Im kurzwelligen Bereich nimmt die Absorption zu. Die Form des Absorptionsspektrums für verschiedene SITS-Konzentrationen zeigt die Abb. 1.

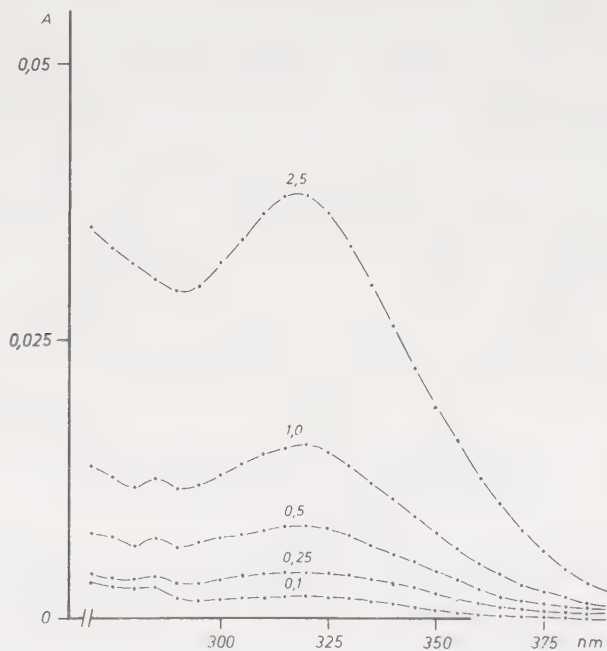


Abb. 1: Absorptionsspektren von SITS (0,1 - 2,5 µM) in 0,2 M Tris-HCl-Puffer (pH = 7,4) im Wellenlängenbereich 260 - 380 nm.

Prüft man die Konzentrationsabhängigkeit der Absorptionsmaxima bei 318 nm, so findet sich Proportionalität und Linearität über den gesamten Untersuchungsbereich, wie die Regressionsgerade zeigt ($Y = 0,0007 + 0,0148 x$; $r = 0,9207$; $0,05 > 2\alpha > 0,01$; Abb. 2).

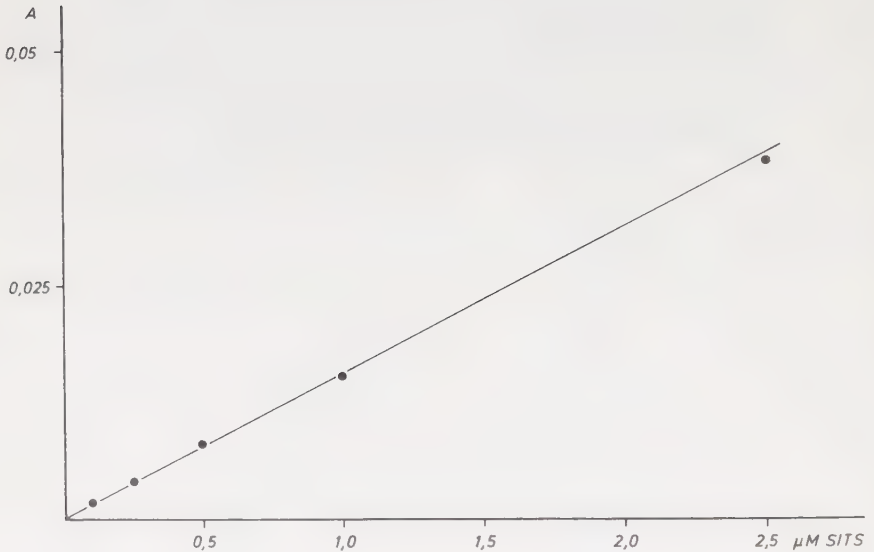


Abb. 2: Abhängigkeit der Absorption bei 318 nm von der SITS-Konzentration

Zur Prüfung einer möglichen Veränderung des Absorptionsspektrums durch die Bindung von SITS an Proteine wurden entsprechende Versuche mit verschiedenen Albuminkonzentrationen unternommen. So verursacht die Zugabe von Albumin (0,5 %) zur SITS-Lösung in Tris-HCl-Puffer weder eine Verminderung noch eine Verschiebung der Absorptionsmaxima.

3.1.2 Absorptionsspektren von SITS nach Zusatz zu Herzmuskelhomogenats

Schreibt man mit Hilfe des Doppelwellenlängenspektrophotometers in der Split-Beam-Methode im Bereich von 250 - 400 nm das Spektrum eines 0,5 %igen Herzmuskelhomogenates (Leerwert) in Tris gegen 0,2 M Tris-Lösung (Abb. 3), so findet sich ein Absorptionsminimum im Bereich von 350 - 370 nm. Zum kurzwelligen Licht hin kommt es zunächst zu einer mäßigen Zunahme der Extinktion, die bei 315 nm stark zuzunehmen beginnt. Das Maximum findet sich bei 280 - 260 nm und dürfte durch den Gehalt an Proteinen und Nukleinsäuren bedingt sein.

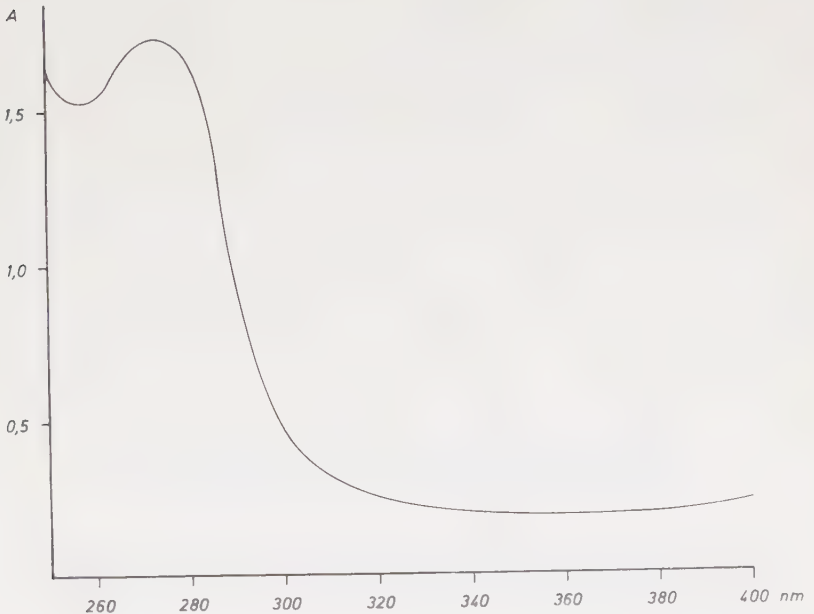


Abb. 3: Absorptionsspektrum von unbehandeltem Herzmuskelhomogenat (0,5 % in 0,2 M Tris-HCl, pH = 7,4)

Gibt man diesem Homogenat verschiedene SITS-Konzentrationen (1,0 - 15,0 μM) zu, so erzielt man besonders im Bereich von 325 nm eine starke Zunahme der Extinktion, wie es in Abb. 4 zu sehen ist.

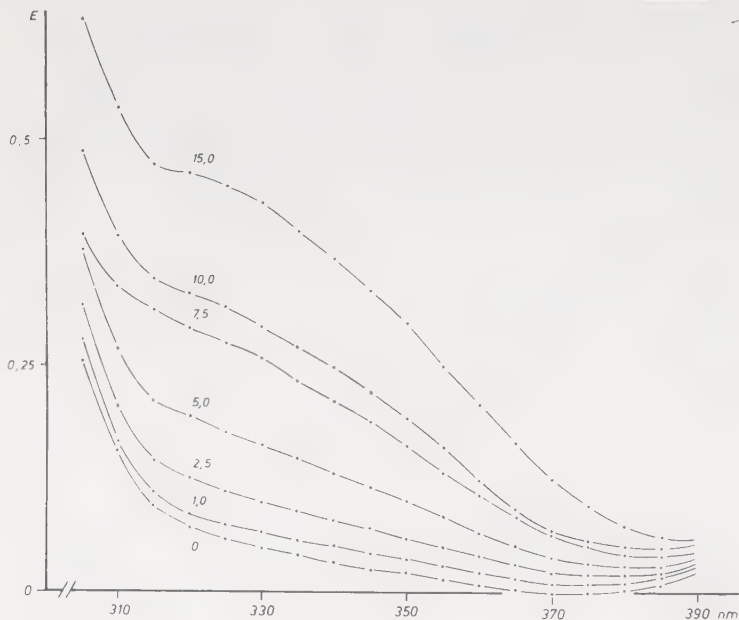


Abb. 4: Absorptionsspektren von 0,5 %igem Herzmuskelhomogenat in 0,2 M Tris-HCl (pH = 7,4) bei Anwesenheit verschiedener SITS-Konzentrationen (0 - 15,0 μM)

Es war nicht möglich, eine Differenzmessung zwischen SITS- vorbehandelten und Kontrollherzmuskelpräparaten zur Bestimmung der SITS-Konzentration vorzunehmen, da die Homogenate verschiedener Herzmuskeln in ihrer Grundabsorption variieren und da man aus der bei 318 nm gemessenen Extinktion allein nicht ausreichend genau auf die SITS-Konzentration im Gewebe zurückschließen kann.

Diese Ungenauigkeit sollte durch Messung der Steigung der Absorptionskurve zwischen 340 und 360 nm (Abb. 4) umgangen werden, da in diesem Bereich die Leerwerthomogenate nur jeweils parallel verschoben waren.

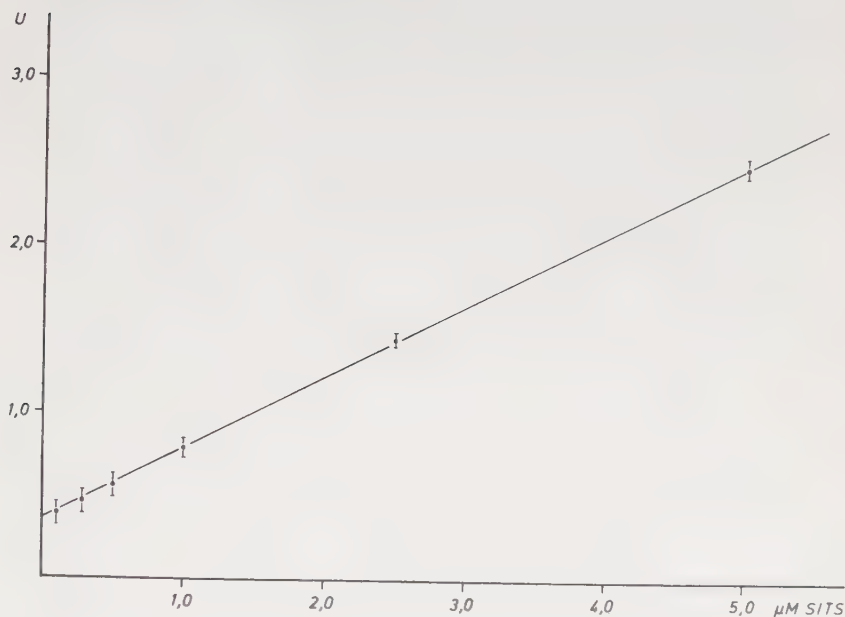


Abb. 5: Abhängigkeit der Steilheit der Absorptionsänderung im Bereich von 340 - 360 nm (angegeben in Einheiten U) von der SITS-Konzentration im Herzmuskelhomogenat. Die eingezeichneten Linien an den Meßpunkten geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

Wie aus Abb. 5 hervorgeht, sind die Steigungen nach Zusatz verschiedener SITS-Mengen zum Homogenat direkt proportional der SITS-Konzentration ($y = 0,3873 + 0,421 x$; $r = 0,87464$; $0,001 > 2\alpha > 0,0005$).

Da die Variable bei der Berechnung der Steigung die Absorptionsdifferenz zwischen 340 und 360 nm ist, kann bei Verwendung DOUBLE WAVE LENGTH-Methode auf die Schreibung des ganzen Spektrums verzichtet und durch eine Messung der Absorptionsdifferenz zwischen zwei Wellenlängen in diesem Bereich ersetzt werden.

Wie aus Abb. 4 hervorgeht, finden sich die größten Absorptionsunterschiede im Verhältnis zum Leerhomogenat zwischen 325 und 360 nm.

Korreliert man diese Absorptionsdifferenz mit den entsprechenden SITS-Konzentrationen, so erhält man wieder eine Gerade (Abb. 6).

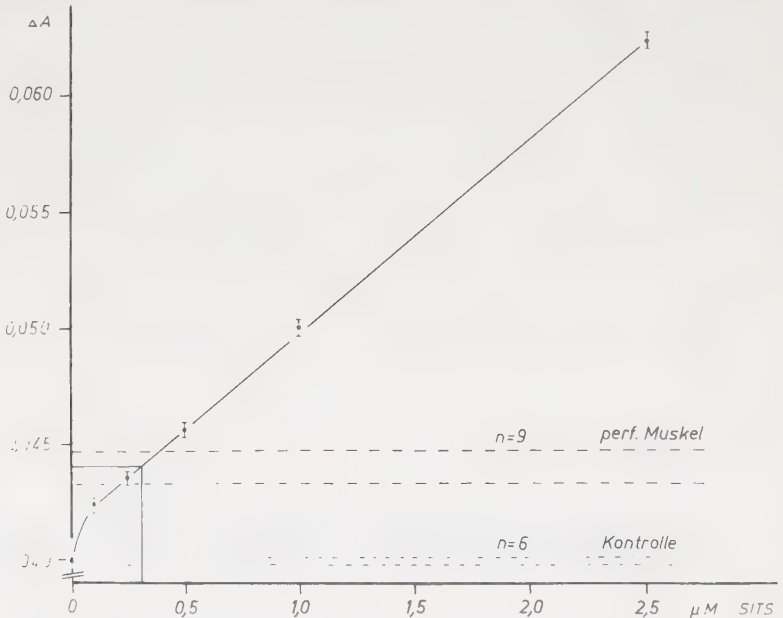


Abb. 6: Abhängigkeit der Absorptionsdifferenz (ΔA) zwischen 325 und 360 nm (DOUBLE WAVE LENGTH-Verfahren) von der SITS-Konzentration im Herzmuskelhomogenat (Durchgezogene Regressionsgerade, basierend auf jeweils 6 Einzelmessungen). Die gestrichelten Linien geben den Streubereich der in Kontrollhomogenaten ($n = 6$) und in mit SITS-haltigen Lösungen perfundierten Muskeln ($n = 9$) gefundenen Meßwerte an. Die eingezeichneten Linien an den Meßpunkten geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

Zur Bestimmung des SITS-Gehaltes von entsprechend vorbehandelten Muskeln wurde deshalb nur die Absorptionsdifferenz zwischen 325 und 360 nm im Doppelwellenlängenspektrophotometer (AMINCO-CHANCE) in der DOUBLE WAVE LENGTH-Methode gemessen.

3.2 Perfusion von Meerschweinchenherzen mit SITS-haltiger Tyrode-Tris-Lösung

3.2.1 Beeinflussung der Kontraktionsamplitude

Bei volumenkonstanter Perfusion (10 ml/Min.) von Meerschweinchenherzen mit Tyrode-Tris-Lösung ergibt sich unter Kontrollbedingungen eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktionsamplitude um 8,5 Prozent in 20 Minuten. Bei Perfusion mit 100 μ M SITS-Tyrode-Tris-Lösung beträgt diese Kontraktionsamplitudenabnahme während der 20minütigen Perfusionsdauer 32 Prozent. Die Zugabe von SITS (100 μ M) hat also einen ausgeprägten negativen inotropen Effekt. Dieser ist durch anschließende Perfusion mit normaler Tyrode-Tris-Lösung nur teilweise reversibel (Abb. 7).

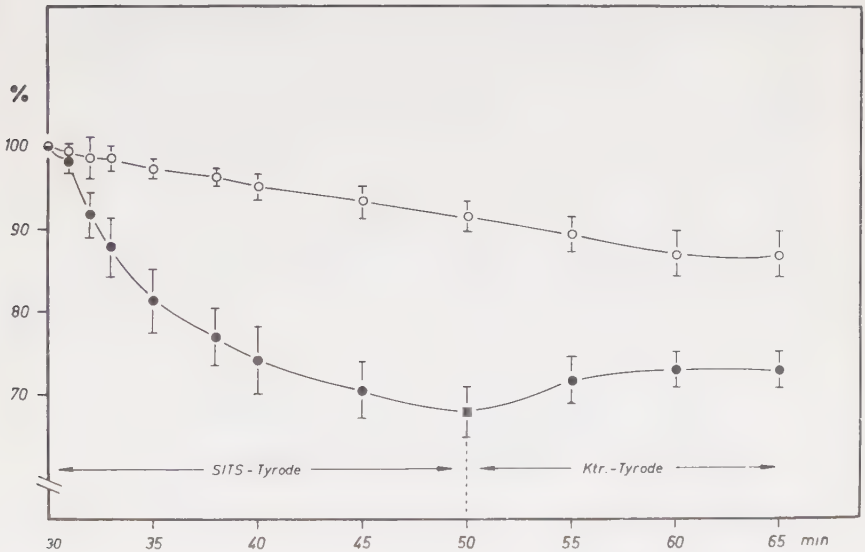


Abb. 7: Prozentuale Änderung der Kontraktionsamplitude isolierter, perfundierter Meerschweinchenherzen in Abhängigkeit von der Perfusionsdauer bei Abwesenheit (offene Symbole) und bei vorübergehender Anwesenheit (geschlossene Symbole) von 100 μ M SITS (n = 6).

Die eingezeichneten Linien an den Meßpunkten geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

3.2.2 Invasions- und Eliminationskurven

Mißt man die SITS-Konzentrationen in dem in halbminütigen Abständen aufgefangenen venösen Perfusat, so kommt es beim Perfundieren mit einer 100 μM SITS-Lösung zu einem sehr raschen Ansteigen der SITS-Konzentration zwischen der ersten und zweiten Minute von 15 μM auf 90 μM . Nach der sechsten Minute ist das Maximum von 100 μM SITS erreicht (Abb. 8).

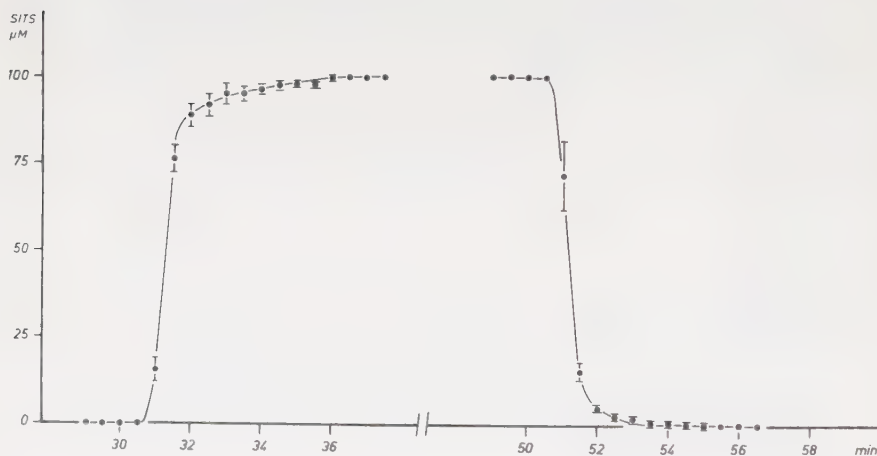


Abb. 8: Zeitverlauf des Anflutens und Auswaschens von SITS an isolierten, perfundierten Meerschweinchenherzen ($n=5$)
Die eingezeichneten Linien an den Meßpunkten geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.
Die Auswaschkurve von SITS zeigt nach der ersten Minute des Auswaschens eine Abnahme der Konzentration auf 72 μM und nach der zweiten Minute auf 5 μM . Nach sechs Minuten kann SITS nicht mehr im Effluent nachgewiesen werden.

3.2.3 Bestimmung des SITS-Gehaltes in den mit SITS-Tyrode-Tris-Lösung perfundierten Herzen (siehe Abb. 6)

Die Absorption des 0,5 %igen Homogenates der Kontrollherzen bei 325 - 360 nm betrug $0,0399 \pm 0,00012$ ($n = 6$) Extinktionseinheiten. Die Absorption der mit $100 \mu\text{M}$ SITS-Tyrode-Tris-Lösung perfundierten und anschließend freigespülten Herzen (0,5 %iges Homogenat) betrug $0,0441 \pm 0,0007$ ($n = 9$).

Diese Werte sind signifikant voneinander unterschieden ($2p \ll 0,001$; $t = 14,3189$).

Danach errechnet sich für die perfundierten Herzen eine SITS-Konzentration von $0,31 \pm 0,09 \mu\text{M}$ im 0,5 %igem Homogenat, d.h. pro g Feuchtgewicht fanden sich $62 \pm 18 \text{ nMol}$ SITS im Herzmuskel. Bei einem Angebot von $20 \mu\text{Mol}$ SITS in 20 Minuten extrahierte das Herz also 62 nMol oder 0,31 %. Das entspricht $3,7 \times 10^{16}$ Moleküle/gFG.

3.3 Fluoreszenzmessungen

3.3.1 Excitations- und Emissionsspektren von SITS

SITS in Tris-Lösung hat bei einer Fluoreszenzanregung zwischen 300 und 347 nm sein Emissionsmaximum bei 450 nm.

Durch Einbringen von SITS in 2 M KOH verschiebt sich das Emissionsmaximum in Richtung des längerwelligen Lichtes nach 500 nm.

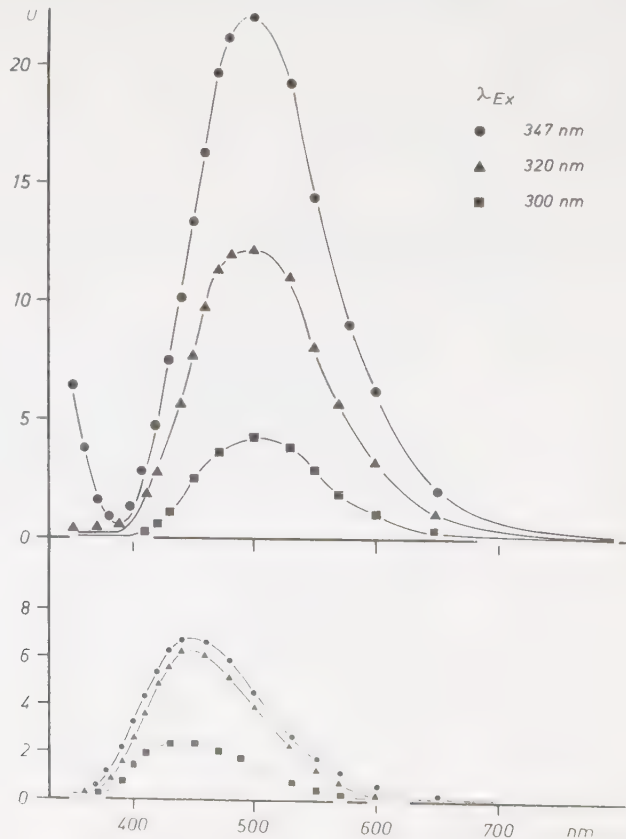
Die stärkste Fluoreszenzanregung, d.h. größte Lichtemission, findet sich bei Anregung durch Licht einer Wellenlänge von 347 nm, unabhängig vom Incubationsmedium.

Die Emissionsmaxima von 347 nm, 320 nm und 300 nm verhalten sich wie 2,8 : 2,6 : 1. Bei SITS in KOH ergibt sich folgendes Verhältnis:

347 : 320 : 300 5,5 : 3 : 1.

Durch KOH wurde die Fluoreszenz von SITS bei Anregung mit einer Wellenlänge von 347 nm um den Faktor 3,2 gegenüber SITS in Tris vergrößert (Abb. 9).

Abb. 9:
Emissionsspektren
von SITS (10 μ M)
bei Anregung mit
verschiedenen
Wellenlängen
(λ_{Ex}). Unterer
Teil: Messung von
SITS in 0,2 M Tris-
HCl. Oberer Teil:
Messung von SITS
in 2 M KOH (Auf der
Ordinate sind will-
kürliche Einheiten
für die Emission
angegeben).



3.3.2 Histologische Untersuchungen

3.3.2.1 Herz

Die fluoreszenzoptischen, histologischen Untersuchungen wurden ausgeführt, um die Lokalisierung des an das Herzmuskelgewebe gebundene SITS festzustellen.

Bei Betrachtung von Schnitten und Kontrollherzen findet sich eine Primärfluoreszenz der Herzmuskelzellen, wobei Fibrillenbündel deutlich erkennbar sind.

Das Bindegewebe zeigt nur geringe Fluoreszenz, während die *Elastica interna* der Gefäße deutlich zur Darstellung kommt (Abb.10).

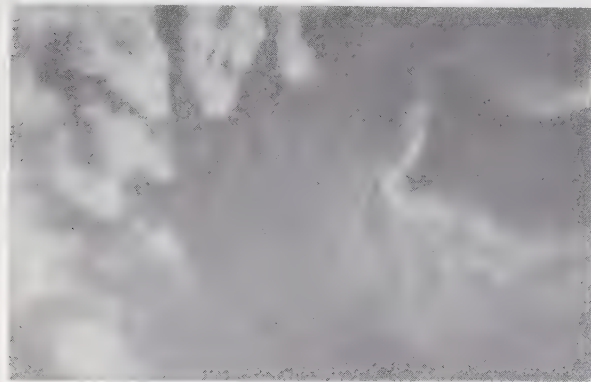


Abb. 10: Fluoreszenzmikroskopisches Bild eines Kontrollherzmuskels
Deutliche Primärfluoreszenz, bläulich-weiß, liefern die elastischen Fasern der *Elastica interna* sowie die Herzmuskulatur, in dieser sind stellenweise Fibrillenbündel sehr gut erkennbar. Das Bindegewebe zeigt nur schwache Emissionen (320 : 1).

Im Gegensatz dazu kommt es bei den mit SITS perfundierten Herzmuskeln zu einer kräftigen Fluoreszenz des Bindegewebes, wobei die Intensität der Fluoreszenz der Muskulatur nicht zugenommen hat.

In der Abb. 11 stellt sich infolge der großen Unterschiede der Intensität der Fluoreszenz die Muskulatur dunkel dar, während das stark fluoreszierende Bindegewebe hell erscheint.

Im Mikrospektralspektroskop (Leitz) findet sich das Maximum der Emission bei 450 - 370 nm und entspricht damit dem vom SITS in Tris-Puffer gemessenen Spektrum.

Unter dem Polarisationsmikroskop zeigte die deutliche Querstreifung, daß der Muskel intakt und nicht hypoxisch geschädigt war.

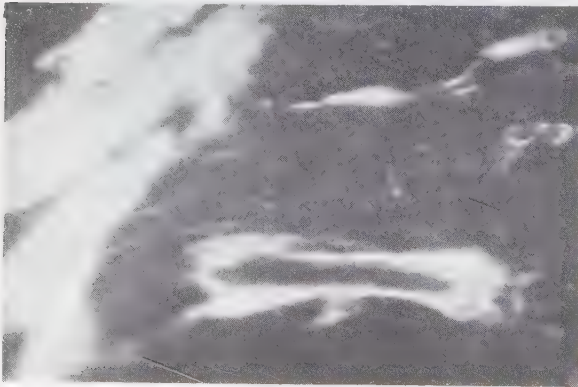


Abb. 11: Herzmuskel nach SITS-Perfusion
Das Bindegewebe und die Gefäßwände zeigen kräftigste Emission mit einer Wellenlänge von 450 - 470 nm. Das Muskelgewebe erscheint hier schwarz, da bei der integralen Messung im Kameramikroskop die Bindegewebeemission stark vorherrscht und die Belichtungszeit bestimmt (320 : 1).

Bei einem, während der Perfusion an der Langendorff-Apparatur starken anoxischen Schädigungen ausgesetztem Muskel fand sich bei Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop eine unerwartet starke Fluoreszenz der Muskelfaser, wie dies in Abb. 12 zu sehen ist. Im polarisierten Licht stellen sich die fluoreszierenden Muskelfasern ohne Querstreifung dar, d.h. diese Muskelzellen waren schwer hypoxisch geschädigt.

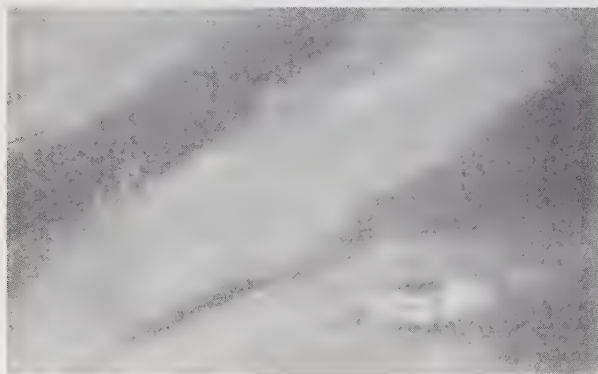


Abb. 12: Durch Anoxie geschädigter Herzmuskel
Hier wesentlich stärkere Farbstoffaufnahme in das
Muskelgewebe als im Bindegewebe (vgl. Abb. 9).
Leuchtende Fluochromierung elastischer Fasern (320:1).



Abb. 13: Leber ohne SITS als Kontrolle

Die Übersichtsaufnahme zeigt Gefäße ohne Besonderheiten und lebhaftes Primärfluoreszenz der Hepatocyten. Die fluoreszierenden Einschlüsse in den Leberzellen blassen schnell aus und sind vermutlich mit dem Vorliegen von Vitamin A in Verbindung zu bringen (320 : 1).

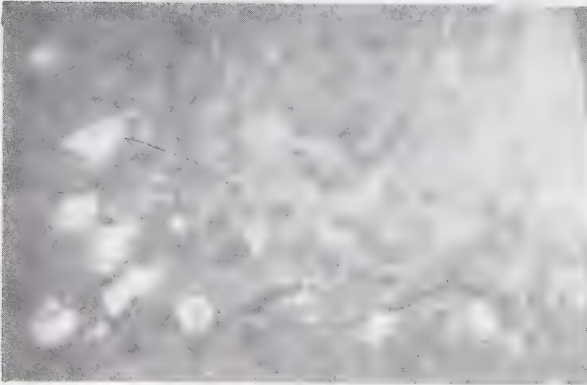


Abb. 14: Leber nach SITS-Perfusion

Intensive Speicherung von SITS in dunklen Leberzellen. Rechts im Bild großer Gallengang, in dessen Epithel SITS rückdiffundiert ist. Hier deutliche Fluochromierung der Gitterfasern im periductulären Bindegewebe (320 : 1).

3.3.2.2 Leber

Da wir bei den histologischen Untersuchungen am Herzen keine Darstellung der Zellmembranen erzielen konnten, führten wir Vergleichsuntersuchungen an der Leber durch, wo von MARINETTI und GRAY⁶ (1967) eine Anreicherung von SITS in der Membranfraktion gefunden wurde. Bei Betrachtung der Leberschnitte ohne Perfusion mit SITS findet sich eine lebhaftige Primärfluoreszenz der Leberzellen und Gefäße ohne Besonderheiten. In den Leberzellen finden sich kleine, stark fluoreszierende Einschlüsse, die schnell ausblassen und deshalb photographisch nicht ausreichend zur Darstellung kommen. Sie dürften Vitamin A entsprechen.

Nach Perfusion der Leber mit SITS-Tyrode-Lösung findet sich in einzelnen Leberzellen kräftige, flächenhaftige Fluoreszenz. Die mit dem Mikrospektralspektroskop gemessenen Emissionen hatten ihr Maximum bei 450 - 470 nm, so daß die Fluoreszenz durch die Speicherung von SITS bedingt sein dürfte. Im Phasenkontrastmikroskop stellen sich diese fluoreszierenden Leberzellen verquollen und strukturlos dar, d.h. es handelt sich um geschädigte Zellen. Wie die Abb. 14 zeigt, findet sich ebenfalls eine stärkere Fluoreszenz im Bereich der Gallengangsepithelien sowie eine Fluochromierung der Gitterfasern.

Diskussion

Die Bestimmung der SITS-Konzentration in nicht-trüben Lösungen kann einmal als Absorptionsmessung bei 354 nm (MADDY⁵) oder unter Ausnutzung der Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffes bei 450 nm, wenn SITS in Tris-Lösung vorliegt, oder bei 500 nm, wenn es in KOH gelöst vorliegt, vorgenommen werden. Die anregende Wellenlänge sollte bei den Fluoreszenzmessungen zwischen 330 und 350 nm liegen.

Voraussetzung bei dieser Art von Messung ist das Vorliegen nicht-trüber Proben. Eine Messung am nicht aufbereiteten Homogenat oder in Zellsuspensionen ist wegen des erheblichen Streulichtes nicht möglich. Erst mit der DOUBLE WAVE LENGTH-Methode (CHANCE² 1954) können auch in trüben Medien Extinktionen sehr genau gemessen werden (COWLES³ 1965). Dadurch, daß man nur diese Extinktionsdifferenz zwischen zwei Wellenlängen mißt (z.B. für SITS zwischen 325 und 360 nm), eliminiert man weitgehend die "unspezifische" Basisabsorption der Probe und kann mit hoher Präzision die "Substanz-spezifische" Absorption erfassen. Wir konnten dies dadurch nachweisen, daß wir Spektren von SITS in 0,5 %igem Herzmuskelhomogenat gegen Tris als Vergleichslösung registriert haben. Dabei werden dann absolute Extinktionen gemessen. Die Auswertung der Spektren bei den oben gewählten Wellenlängen ergab die gleichen Absorptionsdifferenzen wie bei direkter Messung in der DOUBLE WAVE LENGTH-Methode. Zudem war die Extinktionsdifferenz der SITS-Konzentration direkt proportional.

Die Eichkurve zur Bestimmung der SITS-Konzentration im Homogenat wurde so aufgestellt, daß einem Aliquot eines 0,5 %igen Herzmuskelhomogenates, daß als Null-Wert diente, verschiedene SITS-Konzentrationen zugesetzt wurden. Wie die Abb. 6 zeigt, ist die Eichkurve linear und die einzelnen Eichpunkte liegen sehr dicht an der Geraden. Bemerkenswert ist, daß der Schnittpunkt der Eichgeraden mit der Ordinate nicht auf dem Null-Wert der Homogenate liegt, sondern eine höhere Absorption aufweist. Diese Verschiebung in der Absorption des Homogenates ist nicht eindeutig zu interpretieren.

So läßt sich z.B. nicht mit Sicherheit ausschließen, daß eine durch SITS induzierte Änderung das NAD/NADH-Verhältnis geringfügig beeinflusst.

Vergleicht man die in den Perfusionsversuchen gebundene Menge von 62 ± 18 nMol SITS pro g Feuchtgewicht mit dem von MARINETTI und GRAY⁶ (1967) für die Leber angegebenen Wert von 45 nMol pro 18,5 mg Trockengewicht, d.h. einer SITS-Konzentration von ca. 350 nMol pro g Feuchtgewicht, so zeigt sich ein beträchtlicher quantitativer Unterschied (Faktor 5-6). Dieses abweichende Verhalten könnte auf verschiedener Organspezifität beruhen. Es ist jedoch aufgrund der histologischen Untersuchungen an Herz- und Lebergewebe zu bedenken, daß SITS- außer im Bindegewebe - vor allem in geschädigten Zellen gespeichert wird. Bei der von MARINETTI und GRAY⁶ (1967) angewandten Methode zur Herstellung von isolierten Leberzellen, muß damit gerechnet werden, daß eine größere Zahl von Zellen geschädigt war und SITS einlagerte, zumal das Incubationsmedium nicht oxygeniert war. Zudem wurde von den Autoren vor dem Abzentrifugieren der Leberzellen eine Fällung mit TCA 40 % durchgeführt, die den tatsächlichen Wert verfälschen könnte.

Unser Befund, daß SITS vorwiegend von geschädigten Zellen aufgenommen wird, steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen von BENJAMINSON und KATZ¹ (1970), die in Versuchen an Mäuseleber und isolierten Zellen zu dem Schluß kamen, daß SITS sich sehr gut eignet, geschädigte Zellen zu markieren. Eine spezifische Anfärbung der Zellmembran von Leberzellen war auch in diesen Untersuchungen nicht zu finden.

Trotzdem läßt sich aufgrund der vorliegenden Untersuchungen eine Reaktion von SITS mit den intakten Zellen nicht ausschließen. In den Perfusionsversuchen am intakten Herzmuskel wurde nämlich eine geringgradige aber deutliche Abnahme der Kontraktionskraft unter der Einwirkung von SITS beobachtet, die auch nach dem Auswaschen noch weitgehend persistierte. Dieser Befund könnte auf einer Reaktion von SITS mit der Zellmembran oder anderen, für die Steuerung der Kontraktion wesentlichen Strukturen, hindeuten, obwohl die histologischen Untersuchungen keinen derartigen Hinweis ergaben.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die von MADDY⁵ (1964) für Erythrozyten entwickelte und von MARINETTI und GRAY⁶ (1967) auf das Lebergewebe übertragene Darstellung der Zellmembran mit SITS (4 - Acetoamido - 4' - Isothiocyanostilbene - 2, 2' - Disulfonic Acid) wurde hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit zur Markierung von Membranstrukturen im Herzmuskelgewebe untersucht. Zur quantitativen Erfassung wurden spektralphotometrische, zur Ermittlung der subzellulären Lokalisation fluoreszenzoptische Methoden benutzt:

Das Spektralverhalten von SITS in Tris-Tyrode-Lösung mit und ohne Albuminzusatz sowie in 0,5 %igem Herzmuskelhomogenat wurde am Doppelwellenlängenspektrophotometer ermittelt, ferner die Fluoreszenzspektren von SITS bei verschiedenen Excitationswellenlängen am Spektrofluorometer überprüft. Isolierte Meerschweinchenherzen wurden mit 100 μ M SITS-haltiger Tris-Tyrode-Lösung volumenkonstant perfundiert, die dazugehörigen Invasions- und Eliminationskurven bestimmt und das Muskelgewebe anschließend zu einem 5 %igen Homogenat aufgearbeitet. Die SITS-Konzentration im Homogenat wurde am Doppelwellenlängenspektrophotometer in der DOUBLE WAVE LENGTH-Methode gemessen.

Aus formolfixiertem Meerschweinchen-Herzmuskelgewebe und vergleichenden Rattenleberpräparaten wurden nach entsprechender Vorbehandlung mit SITS Gefrierschnitte angefertigt und diese fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

- 7.1 Die Absorptionsmaxima bei 318 nm in den Absorptionsspektren von SITS in einer Tris-Tyrode-Lösung sind den steigenden SITS-Konzentrationen proportional.
- 7.2 Albumin- oder Muskelhomogenatzusatz zur SITS-Lösung verursachen weder eine Verminderung noch eine Verschiebung der Absorptionsmaxima.
- 7.3 Die Absorptionsdifferenz (DOUBLE WAVE LENGTH-Methode) zwischen 325 und 360 nm einer SITS-Lösung zeigt unabhängig von der Grundabsorption eine lineare Konzentrationsabhängigkeit vom SITS-Gehalt.

- 5.4 Bei der Perfusion des isolierten Meerschweinchenherzens mit einer 100 μ M enthaltenen Tris-Tyrode-Lösung war ein ausgeprägter negativ inotroper Effekt festzustellen (ca. 30 %).
- 5.5 Die Invasionskurven für SITS ergaben, daß innerhalb von 6 Minuten ein Gleichgewichtszustand erreicht war. Die Eliminationskurven zeigten einen ähnlich raschen Zeitverlauf, nach 6 Minuten ließ sich im Perfusionsmedium kein SITS mehr nachweisen.
- 5.6 Nach Äquilibration der isolierten, perfundierten Meerschweinchenherzen mit einer 100 μ M enthaltenden Tris-Tyrode-Lösung und dem Auswaschen des freien SITS ließen sich im Homogenat im Mittel 62 nMol SITS pro g Feuchtgewicht in gebundener Form nachweisen.
- 5.7 Die histologische Untersuchung der SITS-vorbehandelten Präparate ergab eine kräftige Fluoreszenz des Bindegewebes. Eine selektive Membrananfärbung war nicht zu erkennen. Bei Muskeln, die anoxischen Schädigungen unterlegen waren, wiesen auch vereinzelte Muskelzellen verstärkte Fluoreszenz auf.
- 5.8 Bei der vergleichenden Untersuchung der isolierten, perfundierten Leber fand sich fluoreszenzoptisch nach der SITS-Vorbehandlung ebenfalls keine selektive Membrandarstellung, dagegen wiesen einzelne Zellen, die polarisationsoptisch verquollen und geschädigt erschienen, eine kräftige flächenhaftige Fluoreszenz aufgrund von SITS-Speicherung sowie Fluochromierung der Gitterfasern und Gallengangsepithelien auf.

Diese Befunde ergeben keinen Hinweis auf eine Eignung von SITS zur selektiven Membrandarstellung am Herzmuskel und im Lebergewebe. Dagegen ist diese Substanz zweifellos ein geeignetes Markierungsmittel für Bindegewebsstrukturen und geschädigte Zellen. Die gegensätzlichen Vorstellungen von MARINETTI und GRAY⁶ (1967) dürften auf fehlende histologische Kontrollen zurückzuführen sein.

6. Literaturverzeichnis

1. BENJAMINSON, M.A. and KATZ, I.J.:

Properties of SITS (4- Acetoamido - 4' - Isothiocyanostilbene - 2, 2' - Disulfonic Acid) Fluorescence and biological staining. Stain Technology 45, 57 - 62 (1970)

2. CHANCE, B.:

Spectrophotometry of intracellular respiratory pigments. Science 120, 767 - 775 (1954)

3. COWLES, J.C.:

Theory of Dual-Wave length spectrophotometry for turbid samples. J. Opt. Soc. Amer. 55, 690 - 693 (1965)

4. LORD, E.:

The use of range in place of standard deviation in the t-Test. Biometrika 34, 41 - 47 (1947)

5. MADDY, A.H.:

A fluorescent label for the outer components of the plasma membrane. Biochim. Biophys. Acta 88, 390 - 399 (1964)

6. MARINETTI, G.V. and GRAY, G.M.:

A fluorescent chemical marker for the liver cell plasma membrane. Biochim. Biophys. Acta 135, 580 - 590 (1967)

LEBENS LAUF

Am 30. August 1943 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Martin Theisen und seiner Ehefrau Margarete geb. Krieger in Koblenz geboren. Zu Ostern 1950 wurde ich in die katholische Volksschule Schleidweiler (Kreis Trier) eingeschult. Ab Ostern 1955 besuchte ich das staatliche Max Planck Gymnasium in Trier, an dem ich 1964 die Reifeprüfung bestand.

Im Anschluß daran wurde ich zum Wehrdienst eingezogen. Nach meiner Entlassung als Leutnant d.R. im Herbst 1966 begann ich an der Johannes Gutenberg Universität zu Mainz das Studium der Medizin.

Nach Ablegung des medizinischen Staatsexamens am 6. Juli 1972 möchte ich jetzt den ersten Teil der Medizinalassistentenzeit in einer Medizinischen Klinik ableisten.

Mainz, den 15. Juli 1972

